

**EINE NEUE MODIFIKATION DER
EHRlich-REAKTION ZUR
QUANTITATIVEN SCHNELLBESTIMMUNG
DER HARNUROBILINKÖRPER**

Franz Huger

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DISSERTATIONS— UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus der
I. Medizinischen Klinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. H. Schwiegl)

EINE NEUE MODIFIKATION DER EHRLICH-REAKTION ZUR QUANTITATIVEN
SCHNELLBESTIMMUNG DER HARNUROBILINKÖRPER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

•

vorgelegt von
Franz Huger
aus München

München 1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Eisenburg

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H.J. Karl

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 7. 1976



gewidmet
meiner lieben Mutter

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. J. Eisenburg sowie Herrn Dr. M. Schmidt für die interessante Themensstellung und für die vielerlei Hilfen materieller und ideeller Art sehr herzlich danken.

Gliederung

I. Einleitung

II. Material und Methodik

1. Material

- a) Urinproben
- b) Spektralphotometer
- c) Hg-Linienphotometer
- d) Glaswaren
- e) Reagenzien

2. Methodik

A. Standardmethode

- a) Durchführung der modifizierten Standardmethode
- b) Präzision der Standardmethode

B. Schnellmethode

- a) Entwicklung der Schnellmethode
- b) Variation der Extraktionsdauer und der Dauer der Urinaufbewahrung
- c) Richtigkeit der Schnellmethode
- d) Präzision der Schnellmethode
- e) Vergleich der spektralphotometrischen und der photometrischen Extinktionsmessung
- f) Spezifität

III. Ergebnisse

1. Entwicklung der Schnellmethode

- a) Vorläufige Schnellmethode
- b) Wahl der richtigen Volumina der jeweiligen Reagenzien
- c) Verkürzungen der Ausschüttelzeiten
- d) Zeitstudie über die Urinhaltbarkeit
- e) Leerwert
- f) Optimierte Analystechnik

2. Richtigkeit

3. Präzision

4. Vergleich Spektralphotometer - Linienphotometer

5. Spezifität

IV. Besprechung

V. Zusammenfassung

- a) deutsch
- b) englisch

VI. Literatur

Lebenslauf

I. Einleitung

Die Bestimmung von Urobilinoidkörpern im Urin basiert im allgemeinen auf zwei Verfahren, dem modifizierten Zinkfluoreszenztest nach SCHLESINGER und der Ehrlichreaktion.

Der Zinkfluoreszenztest ist eine sehr empfindliche Methode, die auch mit kleinsten Urinmengen ausgeführt werden kann. Als halbquantitativer Fluoreszenztest hat er den Nachteil relativ hoher Ungenauigkeit und Unspezifität. Bei dieser Reaktion werden nur die oxydierten Urobilinkörper nachgewiesen. Die Ehrlichreaktion ist im Prinzip einfach auszuführen. Um eine ausreichend hohe Genauigkeit und Spezifität zu erreichen, sind verschiedene Maßnahmen nötig, die den Test dann recht aufwendig werden lassen. Dieser aufwendigen und zeitraubenden Standardmethode, die im wesentlichen von TERWEN (1915), HEILMEYER, KREBS (1931) und WATSON (1936) erarbeitet wurde, steht eine sehr einfache klinisch halbquantitative Fesselmethode gegenüber, die auch mit Teststreifen durchgeführt werden kann, aber mit dem Fehler grober subjektiver Abschätzung der Konzentrationswerte behaftet ist.

Die Reaktionszone des Teststreifens enthält als aktives Reagenz p - Dimethylamino-Benzaldehyd. Durch Eintauchen des Streifens in Urin verfärbt sich das reaktive Feld rotlich, und man kann an Hand einer Faroskala den ungefähren Urobilinogengehalt ablesen.

Dieses Prinzip wird auch in vielen klinischen Laboratorien angewandt, indem man einige Tropfen Ehrlich-Reagenz zu einigen Millilitern Harn gibt und vielleicht zusätzlich noch die Löslichkeit in Chloroform prüft. Alle diese angeführten Nachweismethoden haben Vor- und Nachteile. Bei stetiger Zunahme der Bedeutung der Laboratoriumsdiagnostik erscheint es sinnvoll, eine Methode zu ent-

Der Mechanismus der Ehrlich'schen Reaktion der Urobilinogene wurde von YAMAOKA und Mitarbeitern (1956) untersucht; er nimmt folgenden Reaktionsverlauf an:

Zuerst verbindet sich das Hydrochlorid des p - Dimethylaminobenzaldehyds mit der b - Brücke des Urobilins zu einer Carbinolbase; unter Dehydrierung der Seitenkette des Benzolringes bildet sich hierauf ein p - Chinonring, wonach schließlich die b - Brücke selbst dehydriert wird. Dabei bildet sich aus der Methylenbrücke eine Methenbrücke. Die so entstehende Verbindung stellt dann ein Chromophor vom Typ der Bilene dar, mit dem sich eine auxochrome Gruppe des Chinoins verbindet. Dadurch wird die Farbe in Richtung längerer Wellenlängen verschoben. Hieraus erklärt sich die Rotfärbung. YAMAOKA konnte auch zeigen, daß diese Reaktion durch Spuren von Formaldehyd, welches die zentrale Methylenbrücke blockiert, verhindert wird. Die Benzaldehydreaktion ist nicht absolut spezifisch für Urobilinoide. Auch die im biologischen Flüssigkeiten vorkommenden Pyrrole mit freiem H - Atom in α - Stellung, z.B. die Vorläufer des Porphyrins (Porphobilinogen), geben diese Reaktion. Auch das nach der Aufnahme großer Mengen vegetabilischer Nahrung in der Galle und im Urin auftretende Chlorophyllderivat Phylloerythrinogen reagiert positiv.

Porphobilinogen ist im Gegensatz zu den Urobilinen in saurer Ätherphase unlöslich, während Phylloerythrinogen nicht durch Extraktionsmethoden von den Urobilinen abgetrennt werden kann.

II. Material und Methodik

1. Material

a) Urinproben

Der zur Verwendung gelangte Urin stammte von stationären Patienten, von denen ein großer Teil wegen Lebererkrankungen behandelt wurde. Im allgemeinen wurde der Harn innerhalb von 1 - 2 Stunden nach Miktion verarbeitet; nur der Urin, der auf die Beständigkeit der Urobilinoidkörper untersucht wurde, blieb länger stehen. Die Aufbewahrung erfolgte hierbei im Kühlschrank bei $+5^{\circ}\text{C}$ bis $+8^{\circ}\text{C}$.

b) Spektralphotometer

Die Messung der Extinktion des Urobilinoid - Ehrlichreaktionsproduktes wurde bei 560 nm im Spektralphotometer DBG der Fa. Beckmann mit Registrierung der Absorptionsbande durch einen 20 Zoll-Schreiber durchgeführt. (Registrierbereich von 650 nm bis 520 nm)

c) Hg - Linienphotometer

Für die Vergleichsmessung zur Bestimmung der Urobilinoidkörper mit Photometern wurde das Photometer der Fa. Eppendorf mit Quecksilberdampflampe und Hg - Linienfilter Hg 578 nm herangezogen.

d) Glaswaren

Die Küvetten für die photometrischen Messungen waren aus optischem Spezialglas mit 1 cm bzw. 4 cm Lichtweg.

Bei der Standardmethode wurden zur Reduktion der Urobilinoide 50 ml Schliffkolben, zur Extraktion des Harns nach Reduktion 50 ml Scheidetrichter verwandt.

e) Reagenzien

- 1) Ammoniumeisen-II-sulfatlösung 16% (Mohr'sches Salz),
Merck Nr. 3792
- 2) Gesteuigte wässrige Natriumazetatlösung, mit Natriumazetat,
Merck Nr. 6267
- 3) Eisessig, Merck Nr. 90 062
- 4) Diäthyläther peroxydfrei, Merck Nr. 921
- 5) Natronlauge 12%, hergestellt aus Natriumhydroxyd-Plättchen ,
Merck Nr. 6498
- 6) Berliner'sches Aldehydreagenz Benzaldehydreagenz nach Watson
0,7 g p-Dimethylaminobenzaldehyd, Merck Nr. 3057, gelöst in
150 cm³ 5 n HCl und 100 cm³ aqua dest.
5 n HCl: 250 ml 25% HCl, Merck Nr. 316, und 92 ml H₂O
Berliner'sches Aldehydreagenz, Natriumazetat und Natriumazetat-Lösung sind bei Zimmertemperatur mehrere Jahre haltbar.

2. Methodik

A. Standardmethode

a) Durchführung der modifizierten Benzaldehydreagenz
34 ml Natrium werden zusammen mit 2 ml einer 10%igen Ammoniumeisen-II-sulfatlösung und 2 ml einer 10%igen Natriumazetat-Lösung in 100 ml Benzaldehydreagenz gegeben. Nach Oxidation der Urobilinogenkörper zu verhindern, wird das Gemisch mit einigen Tropfen Petroleum versetzt, verstopft und bei Zimmertemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Nach einer Stunde ist die Reduktion der Urobilinoidkörper zu den entsprechenden reduzierten natürlichen Ausscheidungsprodukten Urobilinogen und Sterkobilinogen vollständig durchgeführt. Die Probe kann nun weiter bearbeitet, d.h. filtriert werden; sie ist bei

Zimmertemperatur ca. 24 Stunden haltbar.

Die Menge des nun verwendeten Filtrats ist von einer Vorprobe abhängig. 2 ml des Filtrats ergeben mit 2 ml Aldehydreagenz und 5 ml gesättigter Natriumazetatlösung eine verschieden intensiv rote Färbung in Abhängigkeit von der Konzentration der Harnurobilinoidkörper. Ist die Farbe der Vorprobe stark rot, empfiehlt es sich, mit 2 ml Harnverdünnung weiterzuarbeiten, bei schwacher Rötung verwendet man besser 20 ml. Das Filtrat (2 ml bzw. 20 ml) wird in einem 50 ml Scheidetrichter zweimal mit jeweils 8 ml eines Eisessig-Äther-Gemisches im Verhältnis 1 : 10 (v : v) ausgeschüttelt und der Urin verworfen. Die vereinigten Eisessig-Äther-Extrakte mit den extrahierten Urobilinoidkörpern werden zweimal mit 8 ml aqua dest. gewaschen, um Verunreinigungen zu vermindern. Schließlich wird die Ätherphase mit 1 ml Ehrlich-Aldehydreagenz 1 - 2 Minuten ausgeschüttelt, die Ehrlichreaktion mit 5 ml gesättigter Natriumazetatlösung gestoppt und die untere wässrige Phase aus dem Scheidetrichter abgelassen. Das Ausschütteln der Ätherphase wird solange wiederholt, bis sich in der wässrigen Phase keine Rotfärbung mehr zeigt. Zur Vereinfachung des Arbeitsganges kann man statt 1 ml Aldehydreagenz auch bis zu 5 ml zum Ausschütteln verwenden, analog erhöht sich dann die Menge des zuzugebenden Natriumazetats bis auf 25 ml. Die vereinigten wässrigen Extrakte stellen die Meßlösung für die spektralphotometrische Extinktionsmessung bei 560 nm dar.

Die Konzentration c der Urobilinoide in 100 ml Harn ergibt sich wie folgt:

$$c \text{ (mg \%)} = \frac{1}{d} \cdot E \cdot F \cdot A$$

c = Konzentration in mg %, d = Schichtdicke in cm

E = Extinktion bei 560 nm, F = Umrechnungsfaktor 0,91

$$A = \frac{\text{Volumen der Meßlösung}}{\text{Meßvolumen } v_F}$$

Das Meßvolumen ist von der Häufigkeit des Ausschüttelns mit Ehrlichreagenz abhängig und setzt sich aus Aldehydreagenz und Natriumazetatlösung zusammen. Das im Quotient A angeführte Harnvolumen v_F stellt das Harnvolumen dar, das dem weiter verarbeiteten Teil des Filtratvolumens entspricht. Das zur Ehrlichreaktion verwendete Harnvolumen v_F beträgt bei 2 ml Filtrat $\frac{34}{50} \cdot 2 = 1,36$ ml, bei 20 ml Filtrat $\frac{34}{50} \cdot 20 = 13,6$ ml.

b) Präzision der Standardmethode

Der Harn eines Patienten wurde an drei Tagen nach Aufteilung in 5, 5 und 2 identische Teilproben mit der Standardmethode auf den Gehalt an Urobilinoiden untersucht. Für jeden dieser Tage wurde der Konzentrationsmittelwert der Proben errechnet und dann die Einzelwerte in % des Mittelwertes angegeben. Von diesen Werten wurden dann Mittelwert, Standardabweichung, Variationskoeffizient und Standardabweichung des Mittelwertes bestimmt.

B. Schnellmethode

a) Entwicklung der Schnellmethode

Die bei der Standardmethode durchgeführte Reduktion der Urobilin-körper hätte die Schnellmethode zu aufwendig werden lassen; sie wurde deshalb nicht angewendet. Zunächst wurde die optimale Zusammensetzung Eisessig-Äther zur Extraktion der Urobilinoidkörper aus dem Harn ermittelt. Hierbei wie bei der weiteren Entwicklung der Methode war es nötig, zum Vergleich die modifizierte Standardmethode heranzuziehen. Um eine vollständige Extraktion des Urobilins nachzuweisen, wurden einige Tropfen Aldehydreagenz dem extrahierten Urin zugesetzt, ohne eine sofortige Rotfärbung hervorzurufen. Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß durch verschiedene Stoffe im Harn trotz guter Extraktion eine allmähliche Rotfärbung eintreten kann.

Als nächstes wurde das Volumen Ehrlich-Aldehydreagenz bestimmt, mit dem bei einmaligem Ausschütteln Urobilinogen aus der Ätherphase vollständig extrahiert werden konnte; hierbei sollte nach nochmaligem Ausschütteln der Ätherphase mit Aldehydreagenz keine Rotfärbung mehr eintreten.

Schließlich wurde noch untersucht, ob die zugegebene gesättigte Natriumazetat-Lösung, welche die weitere Reaktion des Ehrlichreagenzes mit Urobilinogen verhindern sollte, mit aqua dest. verdünnt werden konnte. Ohne Verdünnung können sich Schlieren bilden, welche die Phasentrennung und die photometrische Extinktionsmessung stören.

b) Variation der Extraktionsdauer und der Dauer der Urinaufbewahrung

Zum Zeitgewinn bei der neuen Methode wurden Zeitstudien über die Ausschüttelzeiten mit dem Äther-Eisessig-Gemisch bzw. mit dem

Ehrlich - Reagenz durchgeführt. Bei jeweils zehn von verschiedenen Patienten stammenden Urinen wurde die Ausschüttelzeit variiert und zwar 60, 30, 15 und 3 Sekunden Schütteldauer mit dem Eisessig - Äther-Gemisch und 120, 60, 45 und 30 Sekunden Schütteldauer mit dem Ehrlich - Reagenz. Die Urobilinogenkonzentrationen der Urine mit der jeweils längsten Schüttelzeit von 60 bzw. 120 Sekunden wurden als hundert Prozent festgesetzt und die Werte, die sich aus den verkürzten Schüttelzeiten ergaben, prozentual berechnet und statistisch ausgewertet.

Außerdem wurde eine Überprüfung der Haltbarkeit des Urins bezüglich der Untersuchung auf Urobilinkörper mit der neuen Schnellmethode angestellt. Die Urobilinkörperbestimmung wurde in frischem Zustand sowie nach vier und sieben Stunden Aufbewahrung bei Zimmertemperatur durchgeführt.

c) Richtigkeit der Schnellmethode

Der Vergleich Standardmethode - Schnellmethode ist als Kriterium für die Brauchbarkeit der neuentwickelten Methode anzusehen. Es wurde der Spearman'sche Korrelationskoeffizient beider Methoden ermittelt und der Wilcoxon - Test für Paardifferenzen durchgeführt. Die Richtigkeit der Schnellmethode wurde durch Berechnung der Regressionsgeraden bestimmt.

d) Präzision der Schnellmethode

Bei 12 Urinen wurde bei je drei Proben die Konzentrationsbestimmung mit der Schnellmethode durchgeführt und die Konzentration der drei Einzelproben in Prozent des jeweiligen Mittelwertes berechnet. Die so erhaltenen Prozentzahlen wurden statistisch wie bei der Präzisionsbestimmung der Standardmethode ausgewertet.

e) Vergleich der spektralphotometrischen und der photometrischen Extinktionsmessung

Es wurde versucht, neben der Messung mit dem Spektralphotometer auch eine Messung mit Hg-Linienphotometern zu ermöglichen. Im Spektralphotometer der Fa. Beckmann konnte bei 560 nm im Bereich des Extinktionsmaximums gemessen werden, während beim verwendeten Eppendorfpotometer die Wellenlänge von 578 nm als benachbarte Hg-Linie gewählt wurde und ein Umrechnungsfaktor bei Anwendung des Photometers notwendig war.

f) Spezifität

Außerdem wurde untersucht, inwieweit verschiedene Substanzen, wie sie auch in Medikamenten vorkommen, durch unspezifische Reaktion eine scheinbare Erhöhung der Urobilinkörperkonzentration bei Anwendung der Schnellmethode bewirken, wenn sie in reiner, gelöster Form dem Harn zugesetzt werden.

Ehrlich - Reagenz durchgeführt. Bei jeweils zehn von verschiedenen Patienten stammenden Urinen wurde die Ausschüttelzeit variiert und zwar 60, 30, 15 und 3 Sekunden Schütteldauer mit dem Eisessig - Äther-Gemisch und 120, 60, 45 und 30 Sekunden Schütteldauer mit dem Ehrlich - Reagenz. Die Urobilinogenkonzentrationen der Urine mit der jeweils längsten Schüttelzeit von 60 bzw. 120 Sekunden wurden als hundert Prozent festgesetzt und die Werte, die sich aus den verkürzten Schüttelzeiten ergaben, prozentual berechnet und statistisch ausgewertet.

Außerdem wurde eine Überprüfung der Haltbarkeit des Urins bezüglich der Untersuchung auf Urobilinkörper mit der neuen Schnellmethode angestellt. Die Urobilinkörperbestimmung wurde in frischem Zustand sowie nach vier und sieben Stunden Aufbewahrung bei Zimmertemperatur durchgeführt.

c) Richtigkeit der Schnellmethode

Der Vergleich Standardmethode - Schnellmethode ist als Kriterium für die Brauchbarkeit der neuentwickelten Methode anzusehen. Es wurde der Spearman'sche Korrelationskoeffizient beider Methoden ermittelt und der Wilcoxon - Test für Paardifferenzen durchgeführt. Die Richtigkeit der Schnellmethode wurde durch Berechnung der Regressionsgeraden bestimmt.

d) Präzision der Schnellmethode

Bei 12 Urinen wurde bei je drei Proben die Konzentrationsbestimmung mit der Schnellmethode durchgeführt und die Konzentration der drei Einzelproben in Prozent des jeweiligen Mittelwertes berechnet. Die so erhaltenen Prozentzahlen wurden statistisch wie bei der Präzisionsbestimmung der Standardmethode ausgewertet.

e) Vergleich der spektralphotometrischen und der photometrischen Extinktionsmessung

Es wurde versucht, neben der Messung mit dem Spektralphotometer auch eine Messung mit Hg-Linienphotometern zu ermöglichen. Im Spektralphotometer der Fa. Beckmann konnte bei 560 nm im Bereich des Extinktionsmaximums gemessen werden, während beim verwendeten Eppendorffphotometer die Wellenlänge von 578 nm als benachbarte Hg-Linie gewählt wurde und ein Umrechnungsfaktor bei Anwendung des Photometers notwendig war.

f) Spezifität

Außerdem wurde untersucht, inwieweit verschiedene Substanzen, wie sie auch in Medikamenten vorkommen, durch unspezifische Reaktion eine scheinbare Erhöhung der Urobilinkörperkonzentration bei Anwendung der Schnellmethode bewirken, wenn sie in reiner, gelöster Form dem Harn zugesetzt werden.

III. Ergebnisse:

1. Entwicklung der Schnellmethode

Wegen des großen Zeitbedarfs wurde die Reduktion des Urins mit alkalischem Ammonium Eisen-II-sulfat für die Schnellmethode als ungünstig erachtet. Um die optimale Zusammensetzung der Extraktionsgemische für die Extraktion des Harns bzw. der Ätherphase festzustellen, mußte zunächst eine vorläufige Schnellmethode zum Vergleich mit der Standardmethode angewendet werden. Die Volumina der einzelnen Reagenzien sowie das Verfahren wurden im Prinzip von der Standardmethode abgeleitet.

a) Vorläufige Schnellmethode

5 ml eines frischen Urins werden mit einem Gemisch von 6 ml Eisessig und 24 ml Diäthyläther 2 Minuten lang ausgeschüttelt. Der Urin wird dann abgelassen. Es werden 10 ml der Ätherphase entnommen, mit 10 ml Ehrlich - Reagenz versetzt und ebenfalls 2 Minuten ausgeschüttelt. Die wässrige Phase mit dem Ehrlich-Urobilinogen-Reaktionsprodukt wird zur Messung im Spektralphotometer verwendet.

Die Konzentration c ergibt sich entsprechend der Standardmethode

$$\text{zu : } c = \frac{1}{d} \cdot F \cdot E \cdot \frac{\text{Volumen der Meßlösung}}{\text{Harnvolumen}}$$

b) Wahl der richtigen Volumina der jeweiligen Reagenzien

Variiert man das Volumen von jeweils einem Reagenz bei der vorläufigen Schnellmethode, so lassen sich durch Vergleich mit der Standardmethode Aufschlüsse über die günstigen Volumina der einzelnen Reagenzien gewinnen. Zunächst wurde die Zusammensetzung des Eisessig-Äther-Gemisches verändert. Es ergab sich, daß mit abnehmenden Eisessigvolumina (z. B. 2 oder 4 ml statt 6 ml) die Ausbeute an Uro-

bilinkörpern immer geringer wird; ein Anteil von 4-5 ml Eisessig auf 26-25 ml Diäthyläther erwies sich als ausreichend. Die Harnurobilinoide werden bei dieser Zusammensetzung praktisch vollständig in die Eisessig - Ätherphase übergeführt, so daß auch bei pathologisch stark erhöhten Urobilinogenkonzentrationen im Harn sich bei einem zweiten Ausschütteln mit dem Eisessig - Äther - Gemisch keine Urobilinoide mehr nachweisen ließen.

Das Verhältnis 1:1 des Eisessig - Äther - Gemisches zum Ehrlich - Reagenz erwies sich als optimal. Es ist hierbei wichtig, daß bei Urinen mit hohem Urobilinoidgehalt die Urobilinoide aus der Ätherphase vollständig in die wässrige Phase übergeführt werden. Dies konnte dadurch gezeigt werden, daß ein zweites Ausschütteln des Eisessig - Äther - Gemisches mit dem Ehrlich - Reagenz keine Rotfärbung mehr erbrachte. Bei Verwendung von kleineren Volumina von Ehrlich - Reagenz können nicht die gesamten Urobilinoide aus der Ätherphase extrahiert werden. Eine Erhöhung des Ehrlich - Reagenz-Volumens erbrachte keine verbesserte Extraktion.

Bei dieser vorläufigen Schnellmethode ohne Zugabe von Natriumazetat-lösung ergeben sich niedrigere Konzentrationswerte für Urobilinoide als beim Vergleich mit Zugabe von Natriumazetat-lösung. Mit Natriumazetat-lösung wird die Reaktion des Urobilinoids mit dem Ehrlich - Reagenz gestoppt. Es erwies sich als günstig, das gesättigte Natriumazetat mit aqua dest. im Verhältnis 1:1 zu verdünnen. Dabei erfolgt die Phasentrennung schneller und schärfer, als wenn man gesättigte Natriumazetat-lösung zugibt. Nachdem im Prinzip die Schnellmethode entwickelt war, konnten wir durch Reduktion der Volumina eine Vereinfachung des Analysenganges bei verringertem Urinbedarf erreichen. Somit ergab sich für die optimierte Schnellmethode hinsichtlich der Urin- bzw. Reagenzvolumina:

2 ml Urin, 2 ml Eisessig + 10 ml Diäthyläther, 12 ml Ehrlich - Rea-

III. Ergebnisse:

1. Entwicklung der Schnellmethode

Wegen des großen Zeitbedarfs wurde die Reduktion des Urins mit alkalischem Ammoniumeisen-II-sulfat für die Schnellmethode als ungünstig erachtet. Um die optimale Zusammensetzung der Extraktionsgemische für die Extraktion des Harns bzw. der Ätherphase festzustellen, mußte zunächst eine vorläufige Schnellmethode zum Vergleich mit der Standardmethode angewendet werden. Die Volumina der einzelnen Reagenzien sowie das Verfahren wurden im Prinzip von der Standardmethode abgeleitet.

a) Vorläufige Schnellmethode

5 ml eines frischen Urins werden mit einem Gemisch von 6 ml Eisessig und 24 ml Diäthyläther 2 Minuten lang ausgeschüttelt. Der Urin wird dann abgelassen. Es werden 10 ml der Ätherphase entnommen, mit 10 ml Ehrlich - Reagenz versetzt und ebenfalls 2 Minuten ausgeschüttelt. Die wässrige Phase mit dem Ehrlich-Urobilinogen-Reaktionsprodukt wird zur Messung im Spektralphotometer verwendet. Die Konzentration c ergibt sich entsprechend der Standardmethode

$$\text{zu : } c = \frac{1}{d} \cdot F \cdot E \cdot \frac{\text{Volumen der Meßlösung}}{\text{Harnvolumen}}$$

b) Wahl der richtigen Volumina der jeweiligen Reagenzien

Variiert man das Volumen von jeweils einem Reagenz bei der vorläufigen Schnellmethode, so lassen sich durch Vergleich mit der Standardmethode Aufschlüsse über die günstigen Volumina der einzelnen Reagenzien gewinnen. Zunächst wurde die Zusammensetzung des Eisessig-Äther-Gemisches verändert. Es ergab sich, daß mit abnehmenden Eisessigvolumina (z. B. 2 oder 4 ml statt 6 ml) die Ausbeute an Uro-

bilinkörpern immer geringer wird; ein Anteil von 4-5 ml Eisessig auf 26-25 ml Diäthyläther erwies sich als ausreichend. Die Harnurobilinoide werden bei dieser Zusammensetzung praktisch vollständig in die Eisessig - Ätherphase übergeführt, so daß auch bei pathologisch stark erhöhten Urobilinogenkonzentrationen im Harn sich bei einem zweiten Ausschütteln mit dem Eisessig - Äther - Gemisch keine Urobilinoide mehr nachweisen ließen.

Das Verhältnis 1:1 des Eisessig - Äther - Gemisches zum Ehrlich - Reagenz erwies sich als optimal. Es ist hierbei wichtig, daß bei Urinen mit hohem Urobilinoidgehalt die Urobilinoide aus der Ätherphase vollständig in die wässrige Phase übergeführt werden. Dies konnte dadurch gezeigt werden, daß ein zweites Ausschütteln des Eisessig - Äther - Gemisches mit dem Ehrlich - Reagenz keine Rotfärbung mehr erbrachte. Bei Verwendung von kleineren Volumina von Ehrlich - Reagenz können nicht die gesamten Urobilinoide aus der Ätherphase extrahiert werden. Eine Erhöhung des Ehrlich - Reagenz-Volumens erbrachte keine verbesserte Extraktion.

Bei dieser vorläufigen Schnellmethode ohne Zugabe von Natriumazetat-lösung ergeben sich niedrigere Konzentrationswerte für Urobilinoide als beim Vergleich mit Zugabe von Natriumazetat-lösung. Mit Natriumazetat-lösung wird die Reaktion des Urobilinoide mit dem Ehrlich - Reagenz gestoppt. Es erwies sich als günstig, das gesättigte Natriumazetat mit aqua dest. im Verhältnis 1:1 zu verdünnen. Dabei erfolgt die Phasentrennung schneller und schärfer, als wenn man gesättigte Natriumazetat-lösung zugibt. Nachdem im Prinzip die Schnellmethode entwickelt war, konnten wir durch Reduktion der Volumina eine Vereinfachung des Analysenganges bei verringertem Urinbedarf erreichen. Somit ergab sich für die optimierte Schnellmethode hinsichtlich der Urin- bzw. Reagenzvolumina:

2 ml Urin, 2 ml Eisessig + 10 ml Diäthyläther, 12 ml Ehrlich - Rea-

genz, 15 ml halbgesättigte Natriumazetatlösung.

c) Verkürzungen der Ausschüttelzeiten

Weitere Verbesserungen der neuen Methode konnten durch Verkürzungen der Ausschüttelzeiten erreicht werden. So erwies sich für das Eisessig-Äther-Gemisch eine Schüttelzeit von 15 Sekunden als vollkommen ausreichend, meistens genügen schon 3 Sekunden.

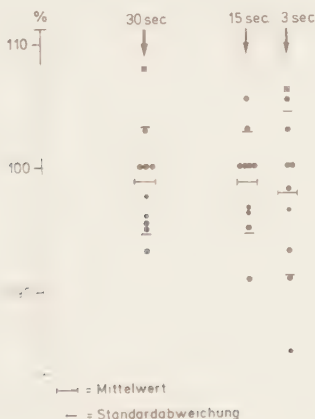


Abb. 1

Extraktion von Urin mit Eisessig - Äther

Schüttelzeit in sec.	Mittelwert in %	Standardab- weichung in %	Signifikanz p
60	100		
30	98,7	4,4	nicht signifikant
15	98,7	4,2	< 0,05
3	97,7	6,7	nicht signifikant

Bei 10 untersuchten pathologischen Fällen, bei denen die Urobilinoidkonzentration bei einer Schüttelzeit von 1 Minute jeweils zu 100 Prozent festgesetzt wurde, betrug bei einer Schüttelzeit von 15 bzw. 30 Sekunden der Mittelwert ca. 98,7 %; es bestand also nur

ein geringfügiger Urobilinoidverlust bei einer Schüttelzeitverkürzung um 45 Sekunden (Abb. 1).

Ebenso brachte eine Untersuchung über die Ausschüttelzeit des Eisessig - Äther - Gemisches mit dem Ehrlich - Reagenz eine Reduktion der Schütteldauer.

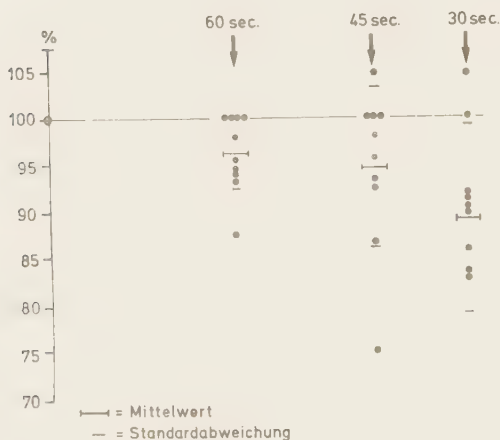


Abb. 2

Extraktion von Eisessig-Äther mit Ehrlich - Reagenz

Schüttelzeit in sec.	Mittelwert in %	Standardabweichung in %	Signifikanz	p
120	100			
60	96,3	4,1	< 0,01	
45	94,6	8,5	< 0,01	
30	89,1	9,9	< 0,01	

Es wurden 10 pathologische Urinproben untersucht und die Urobilinoidkonzentration bei einer Schüttelzeit von 2 Minuten zu 100 Prozent festgesetzt. 1 Minute Schüttelzeit ergab einen Kon-

zentrationismittelwert von 96,3 % bei einer Standardabweichung von 4,1 %; diese Extraktionsausbeute ist für klinische Zwecke ausreichend. Schüttelzeiten von 45 und 30 Sekunden erbrachten Mittelwerte von 94 % und 89 %; hieraus ergibt sich, daß bei weniger als 45 Sekunden die Ausbeute der Extraktion stark abnimmt (Abb. 2).

d) Zeitstudie über die Urinhaltbarkeit

Schließlich war auch noch die Haltbarkeit des Urins für die Untersuchung auf Urobilinoidkörper von Bedeutung.



Abb. 3

Urobilinoidausbeute bei verschiedener Lagerungszeit des Urins
bei Zimmertemperatur

Nach 4 Stunden Aufbewahrung wurden bei 19 Proben ein Durchschnittswert der Urobilinoidkonzentration von 97,4 % gegenüber 100 % in frischem Zustand ermittelt, nach 7 Stunden nur noch 86 %. Die Verringerung der Ausbeute nach 7 Stunden ist hochsignifikant ($p < 0,001$). Es zeigt sich somit, daß der Urin innerhalb weniger Stunden verarbeitet werden sollte (Abb. 3).

Haltbarkeit des Urins

Alter des Urins in h	Mittelwert in %	Standardabweichung in %	Signifikanz p
2	100		
4	97,4	6,1	nicht signifikant
7	86,3	17,9	$p < 0,001$

Untersuchungen mit Aufbewahrung von Urinproben im Kühlschrank bei 4°C, und in einer Kühltruhe bei -17°C mit bzw. ohne Zusatz von Ascorbinsäure (zur Verhinderung der Oxydation) erbrachten bei mehrtägiger Aufbewahrung keine verbesserte Ausbeute. Die mit der Standardmethode durchgeführte Urobilinoidbestimmung zeigte hierbei mit fortschreitender Aufbewahrungsdauer zunehmend geringeren Gehalt an Urobilinoiden.

e) Leerwert

Wiederholte Messungen erwiesen, daß als Leerwert bei der Messung im Spektralphotometer destilliertes Wasser verwendet werden kann. Im dem verwendeten Wellenlängenbereich von 720 nm bis zu 500 nm ergab sich keine Extinktionsdifferenz zu einer Leerprobe bestehend aus Ehrlich - Reagenz und Natriumazetatlösung im Volumenverhältnis 1 : 1.

f) Optimierte Analysentechnik

2 ml Urin werden mit einem Gemisch aus 2 ml Eisessig und 10 ml Diäthyläther in einem 50 ml Scheidetrichter 15 Sekunden ausgeschüttelt. Nach der Trennung der Phasen wird der Urin abgelassen und verworfen. Nun gibt man 12 ml Ehrlich - Reagenz zu, schüttelt eine Minute kräftig und gießt 15 ml halbgesättigte Natriumazetatlösung in den Scheidetrichter. Nach der Phasentrennung ergeben sich nun insgesamt 30 ml wässrige Lösung - nach dem Ausschütteln hat das Volumen des wässrigen Ehrlich - Reagenzes etwas zugenommen -, die abgelassen und zur Messung im Spektralphotometer (gegen aqua dest. als Leerwert) verwendet werden.

Die Messung im Photometer bei Filter Hg 578 nm soll rasch erfolgen, um Verluste zu vermeiden. Sind die Reagenzien bereitgestellt, so kann eine Probe in etwa 5-7 Minuten untersucht werden (einschließ-lich Messung im Photometer). Die Konzentration der Urobilinoide ergibt sich wie folgt:

$$c \text{ (mg \%)} = \frac{1}{d} \cdot 0,91 \cdot \frac{30}{2} \cdot E$$

$$c \text{ (mg \%)} = 13,65 \cdot \frac{1}{d} \cdot E$$

Durch Abzug von 0,22 mg % von den Konzentrationswerten wird der Leerwert der Schnellmethode berücksichtigt, wie im folgenden Abschnitt dargelegt wird.

2. Richtigkeit

Bei 18 Urinproben mit normalem und bei 20 Proben mit erhöhtem Urobilinoidgehalt wurden die Konzentrationen jeweils mit der modi-

fizierten Standardmethode und der Schnellmethode ermittelt und die Differenz (Konzentrationen der Schnellmethode minus Konzentrationen der Standardmethode) gebildet.

Urin mit normalem
Urobilinoidgehalt

Urin mit erhöhtem
Urobilinoidgehalt

18 Proben

20 Proben

Mittelwert der Konzentrationsunterschiede:

0,29 mg %

0,16 mg %

Im Durchschnitt ergab also die Schnellmethode höhere Konzentrationswerte als die modifizierte Standardmethode, was sich bei Urinen mit normalem Urobilinoidgehalt wiederum stärker zeigt als bei Proben mit erhöhter Urobilinoidkonzentration.

Um die Genauigkeit der Schnellmethode zu erhöhen, wurde ein Korrekturkoeffizient eingeführt. Er stellt mit 0,22 mg % etwa das Mittel der durchschnittlichen Konzentrationsdifferenz bei Schnellmethode und modifizierter Standardmethode dar und ist von dem bei der Schnellmethode erhaltenen Wert der Urobilinoidkonzentration zu subtrahieren.

$$c \text{ (mg \%) }_{\text{korr.}} = 13,65 \cdot \frac{1}{d} \cdot E - 0,22$$

Beim Vergleich der Schnellmethode mit der Standardmethode im Normalbereich sowie bei pathologisch erhöhter Urobilinoidkörperkonzentration kann die Richtigkeit den Regressionsgeraden beider Methoden entnommen werden ($y = a + bx$).

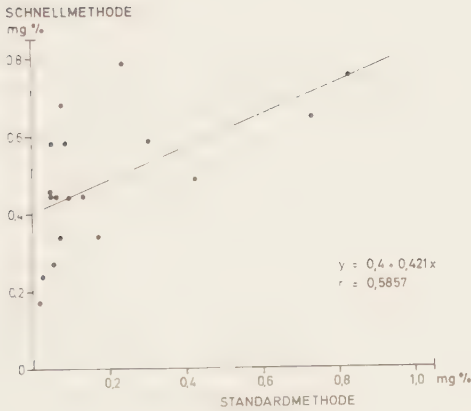


Abb. 4

In Abbildung 4 ist die Regressionsgerade im Normalbereich ohne Berücksichtigung des Korrekturwertes dargestellt. Im Normalbereich ergibt der Abzug des Korrekturwertes 0,22 mg % von den Ergebnissen der Schnellmethode eine erhöhte Richtigkeit mit Reduzierung des Ordinatenabschnittes von 0,4 auf 0,18. Die Richtigkeit der Schnellmethode ist jedoch im Normalbereich entsprechend $b = 0,42$ nicht gut.

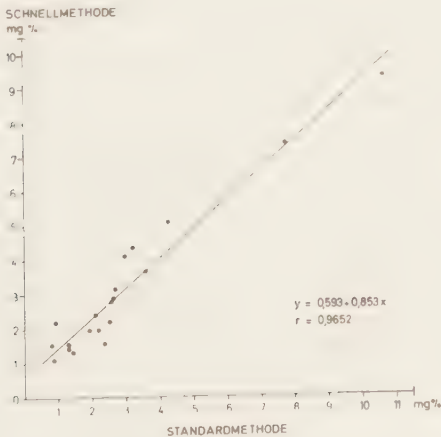


Abb. 5

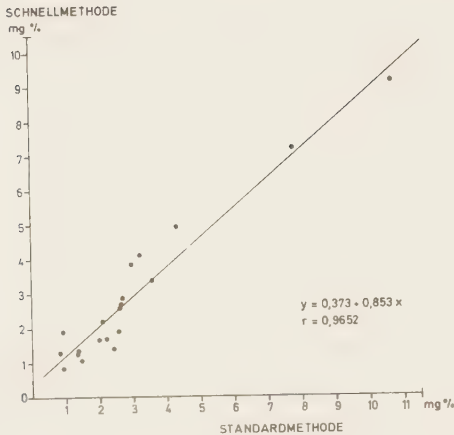


Abb. 6

Abbildung 5 und 6 zeigen die Regressionsgeraden im pathologischen Bereich ohne bzw. mit Korrektur.

Bei pathologisch erhöhter Urobilinoidkörperkonzentration besteht mit Verwendung des Korrekturkoeffizienten eine für klinisch - chemische Untersuchungen ausreichende Richtigkeit der Schnell - methode ($a = 0,37$, $b = 0,85$, Abb. 6).

Zum Vergleich von Schnellmethode und modifizierter Standardmethode wurde auch der Wilcoxentest für Paardifferenzen durchgeführt und der Spearman'sche Korrelationskoeffizient ermittelt.

		Signifikanz p	Spearman'scher Korrelationskoeffizient R
Normal- urin	unkorrigiert	0,001	$R = 0,649$ ($p < 0,01$)
	korrigiert	keine	$R = 0,670$ ($p < 0,01$)
Path. Urin	unkorrigiert	keine	$R = 0,896$ ($p < 0,001$)
	korrigiert	keine	$R = 0,9103$ ($P < 0,001$)

3. Präzision

Standardmethode:

Die Konzentrationswerte, die sich jeweils für 2, 5 und 5 identische Proben ergaben, wurden in Prozent des zugehörigen Mittelwertes (100 %) berechnet. Es ergibt sich der Variationskoeffizient von 8,6 % (Konzentrationsmittelwert 0,4 mg %).

Schnellmethode:

Die Bestimmung der Präzision der Schnellmethode erfolgt entsprechend der Bestimmung der Präzision der Standardmethode; der Variationskoeffizient von 2,5 % entspricht einer guten Präzision (Konzentrationsmittelwert 2,24 mg %).

4. Vergleich Spektralphotometer - Linienphotometer

Durch spektralphotometrische Extinktionsmessung bei 560 nm sowie gleichzeitig durchgeführter photometrischer Extinktionsmessung mit Filter Hg 578 nm bei 15 Proben konnte eine Eichkurve für die photometrische Konzentrationsbestimmung erstellt werden.

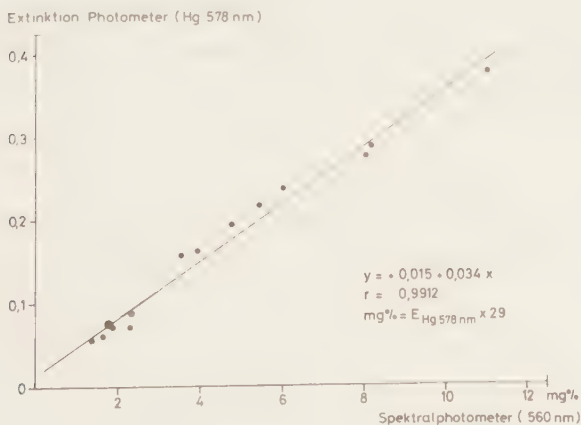


Abb. 7

Der Umrechnungsfaktor bei Benutzung des Hg-Linienphotometers beträgt 29 (Abb. 7).

$$\text{mg \%} = E_{\text{Hg } 578 \text{ nm}} \times 29$$

Durch Vergleich der spektralphotometrisch bestimmten Konzentrationswerte (x) mit den entsprechend der Eichkurve berechneten photometrischen Konzentrationswerten (y) ergibt sich die Regressionsgerade $y = 0,47 + 0,985 x$, welche eine gute Richtigkeit der photometrischen Methode zeigt.

5. Spezifität

60 mg Indoxylsulfat, gelöst in 5 ml Methanol, 100 mg Sulfanilamid und 6 mg Tryptophan wurden jeweils 100 ml Urin mit normalem Urobilinoidgehalt zugesetzt.

Bei Anwendung der Schnellmethode ergab sich im Vergleich zur unveränderten, vom gleichen Patienten stammenden Urinprobe bei der Messung bei 560 nm in keinem Fall eine Änderung der Extinktion. Beim Indoxylsulfat zeigte sich bei der Messung ein weiteres Extinktionsmaximum bei 478 nm, doch verläuft der Anstieg der Extinktionskurve relativ steil, so daß der Extinktionsbereich bei 560 nm nicht beeinträchtigt wird.

IV. Besprechung

Die Methode der quantitativen Bestimmung der Harnurobilinoide konnte sich entsprechend der aufwendigen Analystechnik - Reduktion der Urobilinoide, Waschungen des ätherischen Harnextraktes nach mehreren Extraktionen des Harns, mehrere Extraktionen der Ätherphase mit Ehrlich - Reagenz - in der klinischen Diagnostik nicht durchsetzen. Hierfür wurden vorzugsweise halbquantitative Methoden ohne Reduktion der Urobilinoide verwendet. In den letzten Jahren erfolgte diese halbquantitative Urobilinoidbestimmung vor allem mit Stäbchentests, welche entsprechend der Ehrlichreaktion die Konzentrationsstufen <1,1,2,4 und 8 mg % abzuschätzen erlaubten. Diese Stäbchentests werden jedoch den Erfordernissen der klinischen Diagnostik, insbesondere der Diagnostik hepatischer Erkrankungen - Harnurobilinoiderhöhung als empfindlicher Parameter von Schädigungen des Leberzellstoffwechsels -, nicht voll gerecht.

Die eigene Methode, welche durch systematische Untersuchungen der Standardmethode (Ehrlichreaktion) mit starker Vereinfachung dieser Methode ausgearbeitet wurde, ermöglicht innerhalb von ca. 6-8 Minuten die quantitative Bestimmung der Harnurobilinoide mit einer für klinische Untersuchungen voll ausreichenden Richtigkeit, Reproduzierbarkeit und Spezifität. Das Ziel einer Methode der quantitativen Urobilinoidbestimmung mit für klinische Zwecke vertretbarem Zeitaufwand ist somit bei der eigenen Methode weitgehend erfüllt.

V. Zusammenfassung

Es wurde eine Modifikation der Standardmethode der Harnurobilin-körperbestimmung mit photometrischer Messung des Ehrlichreaktionsproduktes entwickelt. Bei dieser Modifikation wird nicht die zeit-raubende Reduktion der Urobilinoide durchgeführt. Entsprechend dem Vorliegen der Urobilinkörper in reduzierter Form innerhalb der ersten sechs Stunden nach Miktion ist die Reduktion für klinische Urobilinkörperbestimmungen nicht unbedingt nötig. Bei optimal reduzierten Extraktionszeiten werden 2 ml Harn mit 12 ml frisch zubereitetem Eisessig-Äther-Gemisch (Eisessig:Diäthyläther = 2:10; v:v) mindestens 15 Sekunden geschüttelt und der Harn im Scheide-trichter abgelassen. 1 Minute Extraktion der Ätherphase mit 12 ml Ehrlich - Reagenz, Zugabe von 15 ml halbgesättigter Natriumazetat-lösung. Spektralphotometrische Messung der wässrigen Phase bei 560 nm bzw. photometrische Messung mit Filter Hg 578 nm unmittel-bar nach Phasentrennung. Konzentrationsberechnung entsprechend der Extinktion ($\text{mg \%} = 13,65 \cdot E$; Schichtdicke 1 cm).

V. Summary

A modification of the standard method for the determination of urine urobilinoids with photometric measurement of the Ehrlich reaction product has been developed. At this modification the time-consuming reduction of the urobilinoids is not used. Because urobilinoids are present in a reduced state within the first six hours after miction the reduction of urobilinoids is not necessary

for clinical determination. Optimal test conditions are extraction of 2 ml urine with 12 ml freshly prepared acetic-acid-ether (2:10; v:v) for 15 seconds at least and extraction of ether after removal of urine with 12 ml Ehrlich - Reagent for 1 minute. Immediately after extraction addition of 15 ml of a half-saturated solution of sodium acetate. Spectralphotometric measurement of the lower phase at 560 nm respectively photometric measurement with filter Hg 578 nm immediately after separation of phases. Calculation of concentration according to extinction values ($\text{mg \%} = 13,65 \cdot E$; light-path 1 cm).

VI. Literaturangaben

- BLANKENHORN, M.A.: Blood Urobilin. Journal of Biological Chemistry 80, 477 (1928)
- FLORKIN, M., STOTZ, E.H.: Comprehensive Biochemistry. Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York 1963
- HOPPE-SEYLER, THIERFELDER: Handbuch der physiologischen und pathologischen chemischen Analyse. 10. Auflage, Bd. 4, 2, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953
- KUTTER, D., VAN OUDHEUSEN, A.P.M., EISENBERG, K., HENNECKE, A., HELBING, A.R., BUSCH, E.W.: Die Brauchbarkeit eines neuen Teststreifens zum Nachweis von Urobilinogen im Harn. Dtsch. med. Wschr. 98, 112 (1973)
- SCHMIDT, M., FRÖHLICH, G., SCHMIDT, D., STICH, W.: Urobilinkörperstoffwechsel des Menschen: I. Eine neue Methode zur Bestimmung der Urobilinkörper im menschlichen Serum und Harn, Bd. XXII, 120 (1971)
- SCHMIDT, M., PUTTKAMMER, G., EISENBURG, J., STICH, W.: Studies of Human Urobilinoid Metabolism. II. Determination of Urobilinoid Concentration of Human Serum and Urine at Acute Virale Hepatitis. Acta Hepatol.-Gastroenterol. 21, Nr. II, 134 (1974)
- STICH, W.: Biochemie und Funktion des Hämoglobins und verwandter Stoffe. Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. 4, 2, Stoffwechsel II, Springer-Verlag, Heidelberg 1957
- STICH, W.: Die klinischen Gallenfarbstoffreaktionen. 1. Die Ehrlich'sche Aldehyd-Reaktion, Röntgen- und Laboratoriumspraxis. S. Hirzel-Verlag, Stuttgart 1951

STICH, W.: Die klinischen Gallenfarbstoffreaktionen. 2. Die Schlesinger'sche Fluoreszenzreaktion, Röntgen- und Laboratoriumspraxis. S. Hirzel-Verlag, Stuttgart 1952/53

WINTROBE, M.M.: Clinical Hematology. Lea and Febinger, Philadelphia 1957

WITH, F.K.: Bile Pigments. Chemical, Biological and Clinical Aspects. Academic Press, New York-London 1968

Lebenslauf

Am 21. März 1948 wurde ich als Sohn des Bundesbahnbeamten Franz Huger und seiner Frau Maria, geborene Hammerstingl, in Gars/Inn, Landkreis Wasserburg/Inn, geboren. Im Herbst 1952 starb mein Vater. Von 1954 bis 1958 besuchte ich Volksschulen in Mittergars/Inn, Mühldorf/Inn und in München, wo wir seit 1957 wohnen. 1958 trat ich in das Münchner Rupprecht-Gymnasium ein, an der gleichen Schule legte ich 1967 die Reifeprüfung ab. Anschließend wurde ich zur Bundeswehr eingezogen. Im Wintersemester 1968/69 begann ich an der TH München mit dem Studium der Physik und bestand zwei Semester später die 1. Diplomvorprüfung. Ab dem Sommersemester 1970 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München Human- und Zahnmedizin. Für beide Fächer legte ich im Sommer 1972 das Physikum mit der Note "gut" ab. Mit der gleichen Gesamtnote bestand ich im Februar 1976 die ärztliche Prüfung.

